

ZÁRÓJELENTÉS

A „Purinerger receptorok által közvetített hatások komplex vizsgálata – új neuroprotektív terápiás lehetőségek elméleti alapjai” című OTKA témáról

1. P2X₇ receptor eloszlás vizsgálata a központi idegrendszer egyes régióiban RT-PCR technikával

Specifikus P2X₇ receptor szekvenciát tartalmazó RT-PCR primerek segítségével a központi idegrendszer következő területein vizsgáltuk meg a P2X₇ receptort kódoló mRNS eloszlását: frontális cortex, striatum, hippocampus, bulbus olfactorius, agytörzs, gerincvelő. Valamennyi vizsgált agyterületen közel azonos intenzitású, intenzív mRNS expressziót találtunk, eltérően egyéb P2X és P2Y receptor alegységektől, amelyek régió specifikus eloszlást mutattak. Adatainkat az alábbiakban részletezett funkcionális vizsgálatokkal egészítettük ki, és azokkal közös közleményekben publikáltuk (*Sperlágh B. és mtsai, Br. J. Pharmacol. 139: 623-633. 2003; Papp L. és mtsai, J. Pharmacol. Exp. Ther. 310: 973-980, 2004*) illetve az adatok egy részének publikálása még folyamatban van.

2. A P2X₇ receptor szerepe a neurotranszmitter felszabadulás modulációjában a hippocampusban és az idegrendszer egyéb területein

2.1. A P2X₇ receptor szerepe a GABA és glutamát felszabadulás modulációjában

Ebben a kísérletsorozatban morfológiai és neurokémiai technikák segítségével a hippocampusban jelenlevő P2X₇ receptor celluláris és szubcelluláris lokalizációját, valamint a neurotranszmitterfelszabadulás modulációjában játszott szerepét tártuk fel kollaborációs partnerünkkel (Jim Deuchars és csoportja, University of Leeds, UK). Az *in situ* hibridizációs, és fény, valamint elektronmikroszkópos immunhisztokémiai vizsgálatok kimutatták, hogy a receptort kódoló mRNS a hippocampus sejtis rétegeiben található, míg a P2X₇ receptor fehérjére specifikus immunreaktivitás szelektíven az excitátoros végződéseket festi meg, ezek közül is többek között azokat, amelyek gátló GABAerg interneuronokkal szinaptizálnak.

A [³H]GABA felszabadulást tanulmányozó farmakológiai kísérletekben agonista dózishatás görbéket vettünk fel, és hatáserősségi sorrendet állítottunk fel. Az agonisták közül az ATP (1-30 mM, EC₅₀ = 12.7 mM), a BzATP (0.1-6 mM, EC₅₀ = 1.5 mM), illetve az ADP (1-60 mM) koncentráció-függően váltott ki [³H]GABA felszabadulást, amelyekből a következő, elsősorban a P2X₇ receptorra jellemző hatáserősségi sorrend adódott: BzATP>ATP>ADP. Az ATP hatását gátolta a nem szelektív P2X receptor antagonistá TNP-ATP és a PPADS (IC₅₀ = 6.8 μM), és a P2X₇-szelektív antagonisták közül valamennyi, vagyis az oxiATP, a calmidazolium, a Zn²⁺ (IC₅₀ = 0.29 μM) és a Brilliant blue G (BBG, IC₅₀ = 1.6 nM) is. A magnézium-mentes környezet szintén gátolta az ATP hatásának kifejlődését, ami ugyancsak a P2X₇ receptorokra specifikus jelenség. Az egyéb P2X receptorokra szelektív antagonisták viszont (pl. reactive blue 2, NF 279, suramin) nem gátolták az ATP hatását. Az ATP hatásában vizsgálataink szerint nem játszottak szerepet az adenozin, nikotinos és muszkarinos acetilkolin receptorok sem.

Az ATP függő [³H]GABA felszabadulást nem tudtuk kiváltani a szervfürdő 12 °C-ra hűtése esetén, valamint a GABA uptake gátló nipekotinsav (1 mM) jelenlétében, így a feltételezett kiváltó mechanizmus a Na⁺ függő GABA transzporterek megfordulása. Az ATP által kiváltott [³H]GABA felszabadulást emellett szignifikánsan csökkentették az AMPA/kainát glutamát receptorok antagonistái, a CNQX és a gadolínium ion, valamint az akciós potenciál tovaterjedését gátló tetrodotoxin (TTX, 1 μM) is. Ez arra utalt, hogy az ATP GABA felszabadulást kiváltó hatása nagyrészt közvetett, melyet az excitátoros transzmisszió közvetít a glutamáterg rostok és a GABAerg target neuronok között. Ez a feltételezés egybevág az immunhisztokémiai vizsgálatokban kapott adatokkal, mely szerint a P2X₇ receptor immunreaktivitás többek között a GABAerg targettel szinaptikus kapcsolatot létesítő excitátoros végződéseken található. A feltételezés bizonyításaként a P2X₇ receptor aktiváció hatását megvizsgáltuk a [³H]glutamát felszabadulásra is a patkány hippocampus szeleteken.

A [^3H]glutamáttal előinkubált hippocampusz szeletből mind az ATP ($\text{EC}_{50} = 5 \text{ mM}$, maximális hatás 10 mM-nál), mind a BzATP; ($\text{EC}_{50} = 0.5 \text{ mM}$, maximális hatás 3 mM-nál) kiváltotta a triciált transzmitter felszabadulását, s közülük a BzATP bizonyult potensebbek, összhangban a P2X_7 receptorok részvételével.

Végül megvizsgáltuk, hogy az elektromos ingerlés által kiváltott [^3H]GABA felszabadulás szabályozásában részt vesz-e a P2X_7 receptor. Mind a PPADS, mind a P2X_7 receptor antagonistá BBG csökkentette az elektromos ingerléssel kiváltott [^3H]GABA felszabadulást. Ezek az utóbbi eredmények úgy magyarázhatóak, hogy - legalábbis a mi kísérleti körülményeink között - az idegingerlés során felszabaduló endogén ATP részt vesz a [^3H]GABA szövetközi szintjének szabályozásában a hippocampuszban.

Összefoglalva tehát eredményeink feltárták, hogy a patkány hippocampuszban a P2X_7 receptorok aktivációja mind a glutamát, mind a GABA felszabadulást stimulálja a hippocampuszban. Figyelembe véve a frekvenciafüggő ATP felszabadulást ezen az agyterületen, valamint, hogy az ATP-nek alacsony az affinitása a P2X_7 receptorhoz, az általunk leírt mechanizmusnak magas frekvenciájú neuronális kisülés esetében (pl. plaszticitási folyamatok, LTP), vagy olyan körülmények között lehet jelentősége, amikor sejtsejt sérülés, vagy sejtelhárítás (neurodegeneratív betegségek) következtében magas koncentrációjú ATP kerül az extracelluláris térbe. Ez alátámasztja elképzelésünket, mely szerint a P2X_7 receptor ígéretes terápiás célpont lehet neuroprotektív céljára. Eredményeinket a hazai és nemzetközi kongresszusokon, valamint a J. Neurochemistry-ben megjelent cikkben publikáltuk (Sperlágh B. és mtsai, J. Neurochem. 81:1196-1211, 2002).

2.2. A P2X_7 receptorok szerepének igazolása az ATP által kiváltott hippocampális GABA és glutamát felszabadulásban P2X_7 receptor hiányos transzgenikus egérmodell segítségével

A fentiekben vázolt, alapvetően farmakológiai analízissel kapott következtetéseinket alátámasztotta, hogy további vizsgálatainkban P2X_7 receptor null mutáns ($\text{P2X}_7\text{R}^{-/-}$) egértörzs segítségével igazoltuk, hogy az ATP glutamát és GABA felszabadulásra kifejtett serkentő hatását egér hippocampusz szeleteken valóban a P2X_7 receptorok közvetítik. A P2X_7 receptor hiányát a null mutáns egerekben PCR analízissel verifikáltuk. Kísérleteinkben a hippocampusz szeletek radioaktivitás felvétele, a nyugalmi és elektromos ingerlés (35V, 10 Hz, 1 msec) által kiváltott [^3H]glutamát és [^3H]GABA felszabadulás nem különbözött egymástól szignifikánsan a vad típusú ($\text{P2X}_7\text{R}^{+/+}$) és a genetikusan P2X_7 receptor hiányos ($\text{P2X}_7\text{R}^{-/-}$) egerekben. ATP (10 mM) alkalmazásával a vad típusú egerek hippocampusz szeleteiben jelentős mennyiségű [^3H]glutamát és [^3H]GABA felszabadulást lehetett kiváltani, melynek mennyisége az elektromos ingerlés által kiváltott kiáramlás mennyiségével összevethető mértékű volt. Az ATP által kiváltott [^3H]glutamát és [^3H]GABA felszabadulást hasonló mértékben, szignifikánsan gátolta a széles altípus specificitással rendelkező P2 receptor antagonistá PPADS (30 μM), valamint a P2X_7 receptorra szelektív BBG (1 μM). A P2X_7 receptor hiányos ($\text{P2X}_7\text{R}^{-/-}$) egerekben ATP alkalmazásával nem lehetett mérhető mennyiségű [^3H]glutamát és [^3H]GABA felszabadulást kiváltani. Az eredményekből tudományos közlemény (Papp L. és mtsai, Neuroreport 15: 2387-2391 2004) és konferenciaprezentációk születtek.

2.3. P2X receptorok részvétele a noradrenalin felszabadulás szabályozásában patkány hippocampusz szeleteken

További kísérleteinkben arra a kérdésre kerestünk választ, hogy szabályozzák-e a hippocampusz egyéb transzmittereinek felszabadulását P2X_7 , vagy ahhoz hasonló, a transzmitter felszabadulást közvetlenül kiváltó preszinaptikus P2X receptorok. Ezért megvizsgáltuk, hogy a P2X receptor aktiváció hogyan hat a noradrenalin felszabadulásra patkány hippocampusz szeleteken. Az endogén agonista ATP, a P2X receptorok több altípusát aktiváló α,β methyleneATP, valamint ADP alkalmazásával koncentrációfüggő [^3H]noradrenalin felszabadulást tudtunk kiváltani a hippocampusz szeletekből a következő hatáserősségi sorrenddel: α,β methyleneATP > ATP > ADP. Az ATP hatását gátolta a PPADS (30 μM), a P2X_1 és P2X_3 receptorokra szelektív antagonistá NF023 (10 μM) és NF 449 (100 nM). A P2X_7 receptorokra szelektív BBG (100 nM), a P2Y_1 receptorokra szelektív MRS 2179 (10 μM), valamint az adenosin A_1 és A_{2A} receptorokat gátló DPCPX (250 nM) és DMPX (250 nM) ugyanakkor nem befolyásolta az ATP hatását. A hippocampuszt beidegző noradrenerg idegvégződések sejttesteit tartalmazó agytörzsben elvégzett RT-PCR analízis eredménye az ismert P2 receptorok közül a P2X_1 , P2X_2 , P2X_3 , P2X_4 , P2X_6 , P2X_7 , valamint P2Y_1 receptorokat kódoló mRNS expresszióját igazolta, míg a P2X_5 , valamint a P2Y_2 , P2Y_4 és P2Y_6 receptor

mRNS-e nem expresszáldott detektálható mértékben. Mindezek alapján a P2 receptor ligandok [³H]noradrenalin felszabadulást kiváltó hatásáért a legvalószínűbben felelő P2 receptor altípus a P2X₁ és a P2X₃, a többi receptort részben az expresszió hiánya (P2X₅, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆), részben a farmakológiai analízis (P2X₂, P2X₄, P2X₆, P2X₇, P2Y₁, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃, P2Y₁₄) eredménye alapján ki tudtuk zárni. A P2X₇ receptorok részvételére tehát a noradrenalin felszabadulás esetében nem találtunk támogató bizonyítékot. Míg az extracelluláris Na⁺ megvonása és a monoamin transzporter gátló desipramine (10 μM) teljesen felfüggesztette az ATP [³H]noradrenalin felszabadulásra gyakorolt hatását, a Ca²⁺ megvonása nem befolyásolta azt. A P2X receptorok aktivációja tehát [Ca²⁺]_o-független és transzporter-mediált módon, a Na⁺ függő noradrenalin transzporterek közvetlen aktiválása útján idéz elő többlet noradrenalin felszabadulást.

Eredményeink alapján megállapítható, hogy a hippocampusban a noradrenalin és az egyéb transzmitterek (glutamát, GABA) felszabadulását eltérő alegység összetételű serkentő P2 receptorok szabályozzák, és az itt kimutatott, a centrális noradrenerg afferenseken jelenlevő receptor részben hasonlónak tűnik a korábban szimpatikus idegrendszeri noradrenerg idegvégződéseken kimutatott serkentő purinoceptorokkal. Az eredményeinket tudományos közleményben (*Papp L. és mtsai, J. Pharmacol. Exp. Ther. 310:973-980, 2004*), valamint hazai és nemzetközi konferencia-előadásokon is prezentáltuk.

3. ATP által kiváltott purin felszabadulás vizsgálata patkány hippocampusz szeletben

Vizsgálatainkban arra a kérdésre kerestük a választ, hogy befolyásolják-e a purinok önmaguk felszabadulását, és ha igen, létezik-e a purin felszabadulásnak önerősítő jellegű módja. E célból ATP és egyéb nukleotidok és nukleozidok hatását vizsgáltuk a [³H]purin felszabadulásra patkány hippocampusz szeleteken, [³H]adenozin inkubációt követően. A hippocampusz szeleteken 3 perces ATP perfúzió koncentrációfüggő (0.03-3 mM) [³H]purin felszabadulást eredményezett. A trícium jelelölés HPLC analízise során megállapítottuk, hogy a [³H]ATP mennyisége szignifikánsan megemelkedett elektromos téringerlés (25V, 10 Hz, 360 shock), illetve 3 perces ATP (300 μM) perfúziót követően, ami primer ATP felszabadulásra utal. Ugyanakkor a jelzett purinok százalékos összetétele nem különbözött szignifikánsan a kétfajta stimulust követően, vagyis az ATP és az elektromos ingerlés azonos összetételű raktárakból üríti ki a purinokat. Amennyiben az ATP-t folyamatos perfúzióban adagoltuk, a [³H]purin felszabadulás tartósan és nagymértékben megemelkedett. Az emelkedés platóján alkalmazott elektromos téringerlés azonban tovább fokozta a [³H]purin felszabadulást, a kétféle stimulus hatása tehát tisztán additív volt.

Az ATP mellett egyéb purinok, így az ADP, az adenozin, az UTP, az α,βmethyleneATP, a BzATP, valamint az uridine is [³H]purin felszabadulást idéztek elő, bár eltérő hatékonysággal. Közülük az ADP és az adenozin mutatott az ATP-hez hasonló hatékonyságot, a többi analóg viszonylag gyengébb effektust okozott. Luciferin-luciferáz technikával kimutattuk, hogy az adenozin hatására endogén ATP felszabadulás is kiváltható, tehát az ATP analógok triciált purin felszabadulásra gyakorolt hatása nem magyarázható önmagában a trícium jelölés kicserélődésével.

A következő kísérletekben az ATP által kiváltott [³H]purin felszabadulás mechanizmusát tisztáztuk. Első lehetőségként purin receptorok közvetítő szerepét érdemesnek tűnt megvizsgálni, ezért RT-PCR analízissel kimutattuk a hippocampuszban expresszáldó P2 receptorokat kódoló mRNS-eket. A vizsgálat alapján a P2X receptorok közül a P2X₁, P2X₂, P2X₃, P2X₄, P2X₅, P2X₆ és a P2X₇, a P2Y receptorok közül a P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄ és P2Y₆ receptorokat kódoló mRNS erős jelölődést mutatott. Ennek ellenére a vizsgált adenozin (DPCPX és DMPX) és P2 receptor (suramin, PPADS, reactive blue 2) antagonisták egyike sem befolyásolta érdemben az ATP által kiváltott [³H]purin felszabadulást. Így egyéb közvetítő mechanizmusok feltárása irányában folytattuk kísérleteinket. Míg az elektromos ingerlés által kiváltott [³H]purin felszabadulás TTX érzékeny és [Ca²⁺]_o-, valamint [Na⁺]_o-függőnek bizonyult, ugyanezen kezelések nem befolyásolták az ATP által kiváltott [³H]purin felszabadulást. A nukleozid transzporter gátló dipyrídamol (10 μM) és nitrobenziltioinozin (10 μM) ugyanakkor szignifikánsan gátolta az ATP által kiváltott [³H]purin felszabadulást, amely azt mutatja, hogy a purin felszabadulás kiváltásában nukleozid transzporterek is részt vesznek. Mivel tudomásunk szerint a nukleozid transzporterek nukleotidokat nem, csak nukleozidokat transzportálnak, megvizsgáltuk az adenozint szubsztrátként használó adenozin deamináz hatását is az ATP által kiváltott [³H]purin felszabadulásra. Az adenozin deamináz is gátolta az ATP hatását, vagyis minden

bizonyról az ATP az extracelluláris térben adenzinná alakul, mielőtt a karrieren felvevődve és azt megfordítva további purin felszabadulást idézne elő.

Összességében véve tehát kísérleteink a transzmitter felszabadulás egy olyan újfajta mechanizmusát azonosították, amelyeket a purinokkal kapcsolatban még nem írtak le; ez a karrieren által mediált homo- illetve heteroexchange, melynek elsősorban olyan patológiás állapotokban lehet szerepe, amelyek nagyobb mértékű extracelluláris purin akkumulációval járnak (pl. trauma, energiadeplécia, ischemia). Ilyen körülmények között a karrieren felvevődő nukleozidok már meghaladják az adenzinból nukleotidokat szintetizáló, illetve deamináló adenzin kináz és deamináz enzimek kapacitását és a sejten belül felszaporodó adenzin a karrier megfordulását idézheti elő. Eredményeinket a Br. J. Pharmacology-ban közzöltük (*Sperlágh B. és mtsai, Br. J. Pharmacol. 139:623-633, 2003*), amelyhez a cikket méltató szerkesztői levél (Cunha RA, Br. J. Pharmacol. 139:473-4. 2003) is társul.

4. Energiadepriváció, mitokondriális inhibitorok és oxidatív stressz neurotranszmitter felszabadulásra gyakorolt hatásának feltárása

4.1. A noradrenalin felszabadulás vizsgálata a hippocampusban

Az energiadepriváció és az oxidatív stressz fontos patofiziológiai alapjelenségek, melyek neurodegeneratív betegségekben párhuzamosan, vagy egymást következményeként alakulnak ki, és fontos szerepük van az neuronális sejtelhalás előidézésében. Kísérleteinkben az oxidatív stressz és az energiadepriváció kölcsönhatásait vizsgáltuk a neurotranszmitterfelszabadulás és az ionáramok vonatkozásában. Első kísérleti modellünk a patkány hippocampusz szelet volt, melyből [³H]noradrenalin felszabadulást mértünk. Az oxidatív stressz modelljeként hidrogén peroxid (H₂O₂) perfúziót alkalmaztunk, amely ismerten fokozza a szabadgyökképződést az ischemia reperfüziós szakaszában, és amely koncentrációfüggő (0.1-1.5 mM) [³H]noradrenalin felszabadulást idézett elő. A H₂O₂ önmaga is energiadeprivációt okoz – ezt megerősítettük a hippocampusz szeletek nukleotid tartalmának HPLC elemzése során. A mitokondriális inhibitor rotenon (10 μM) és oligomicin (10 μM) ugyancsak csökkentették az energiatöltöttséget jelző hányadosok értéket, önmagukban azonban nem idéztek elő mérhető emelkedést a [³H]noradrenalin felszabadulásban. Ugyanakkor, ha a H₂O₂-t és a mitokondriális inhibitorokat kombinációban alkalmaztuk, supraadditív hatást tapasztaltunk, jóval nagyobb mennyiségű noradrenalin szabadult fel, mint a hidrogén peroxid, illetve a rotenon és oligomicin kombinációja által önmagában okozott hatások összege. Az oxidatív stressz noradrenalin felszabadulásra gyakorolt hatása tehát kifejezettebben érvényesül, ha akár minimális mértékű energiadeplécia talaján történik. A H₂O₂, illetve a rotenon és oligomicin kombináció önmagában is emelkedést okozott az intracelluláris [Na⁺] szintben, supraadditív hatást azonban ez esetben nem tapasztaltunk a kombinációs kezelés hatására.

A H₂O₂ [³H]noradrenalin felszabadulásra gyakorolt hatása hőmérsékletfüggő volt, és a NMDA és non-NMDA típusú glutamát receptor antagonisták CNQX és AP-5 teljesen gátolta azt; a H₂O₂ hatását tehát a glutamáterg transzmisszió közvetíti. Ismert ugyanakkor, hogy a glutamáterg és a noradrenerg varikozitások nincsenek szinaptikus kapcsolatban egymással, így további, diffúzibilis közvetítő mediátorok szerepe merült fel. A nitrogén monoxid szintáz (NOS) gátló L-NAME, illetve a neuronális NOS gátló nitroindazol ugyancsak teljesen kivédte a H₂O₂ hatását. A H₂O₂ feltételezett hatásmódja tehát nem-szinaptikus, elsődlegesen glutamát felszabadulást okoz, mely poszt-szinaptikus receptorait aktiválva nitrogén monoxidot szabadít fel a poszt-szinaptikus targetjéből és az szabadon diffundálva éri el a noradrenerg varikozitásokat noradrenalin kiáramlást előidézve.

Ezeket az eredményeket a Neuroscience-ben, (*Milusheva E. és mtsai, Neuroscience 120:771-781, 2003*) illetve hazai és nemzetközi kongresszusokon publikáltuk.

4.2. A dopamin felszabadulás vizsgálata a striatumban

Ezt követően tovább vizsgáltuk az oxidatív stressz, a mitokondriális inhibitorok és a neurotranszmitter felszabadulás kölcsönhatásait a striatumban, amely az egyik fontos neurodegeneratív betegségben, a Parkinson kórban kitüntetetten károsodó agyterület. Választásunk azért éppen erre az agyterületre esett, mivel a közelmúltban publikált adatok szerint a peszticidként elterjedten használt mitokondriális inhibitor, a

rotenon krónikus adagolásával kísérleti állatokban a Parkinson kórra jellemző szövettani elváltozások és klinikai tünet együttes váltható ki, amely minden korábbi modellnél hűségesebben tükrözi le a humán betegségben tapasztalható elváltozásokat. Mi is ezt a modellt használtuk kísérleteinkben ozmotikus minimumpával adagolt, 2 illetve 4 hetes i.v. rotenon előkezelést alkalmazva. A krónikus rotenon kezelés hatására a striatumban a dopamin szintéziséért felelős enzim, a tirozin hidroxiláz immunfestés jelentős elhalványodását és ezzel párhuzamosan az endogén dopamin tartalom progresszív csökkenését figyeltük meg, amely megfelel a szer feltételezett dopaminerg neuronokat károsító hatásának. A rotenon előkezelést követően ugyanakkor a striatum szeletek csak kismértékben kevesebb [³H]dopamint vettek fel és szabadítottak fel elektromos téringерlés hatására, ami a túlélő neuronok hiperreaktivására utal. Ezt támasztja alá, hogy a szövetben jelenlevő dopamin metabolitok aránya (DOPAC/DA és HVA/DA arány) szignifikánsan megemelkedett. A legmarkánsabb hatást a [³H]dopamin felvételére és az elektromos ingerlés által kiváltott dopamin felszabadulásra a szeletek in vitro rotenon előkezelése okozta, amely nyilvánvalóan gyorsabb és közvetlenebb hatást eredményez, mint az ozmotikus minipumpán keresztül adagolt szubtoxikus rotenon expozíció. Ez utóbbi protokoll ugyanakkor hívebben tükrözi a humán Parkinson kórban feltételezett környezeti rotenon expozíciót. A hidrogén peroxid perfúzióval előidézett oxidatív stressz koncentrációfüggő dopamin felszabadulást idézett elő a striatum szeletekből, amely krónikus rotenon előkezelést követően jelentősen potencírozódott, és a legerőteljesebb potencírozódást ebben az esetben is az in vitro rotenon kezelés esetén tapasztaltuk. A krónikusan rotenonnal kezelt állatokban ezen felül a dopamin toxikus metabolitja, a dopamin kinon is megjelent az extracelluláris térben, ami önerősítő tényezőként maga is forrása lehet a képződő káros szabadgyököknek és az általuk okozott oxidatív stressznek. A striatális kolinerg transzmissziót is vizsgálat alá vetettük; a krónikus rotenon kezelést követően a [³H]kolin felvétel és az ingerlés által kiváltott [³H]acetilkolin felszabadulás fokozódott, ami minden bizonnyal a dopaminerg innerváció párhuzamos kiesése kapcsán kialakuló denervációs hyperszenzitivitás következménye. Ezt támasztja alá, hogy a rotenonnal kezelt állatokban csökkent a D2 receptor antagonistául sulpiride serkentő hatása az acetilkolin felszabadulásra. Megállapíthatjuk tehát, hogy a szubtoxikus krónikus rotenon expozíció a kísérleti állatokban supraadditív hatást gyakorolt a dopaminerg neuronokban az oxidatív stressz dopamin ürítő hatására és az így keletkező toxikus metabolitok képződésére, ami hozzájárulhat a monoaminerg neuronok szelektív károsodásához Parkinson kórban. Eredményeinkből két referált publikáció (*Milusheva E. és mtsai, Free Radical Biology and Medicine 39: 133-142, 2005, Baranyi M. és mtsai, J. Chromatography A, in press*) és több kongresszusi prezentáció született.

4.3. Glutamát receptorok szerepe az energiadepriváció által kiváltott noradrenalin felszabadulásban

Harmadik kísérletsorozatunkban NMDA és non-NMDA típusú receptorok régióspecifikus részvételét vizsgáltuk a [³H]noradrenalin felszabadulás kiváltásában. Az elért eredmények arra engednek következtetni, hogy a CA1 régióban, illetve kisebb mértékben a CA3 régióban a glutamát receptorok szerepet játszanak az energiadeprivációt követő masszív noradrenalin kiáramlás előidézésében, mely hozzájárulhat ezen agyterület ischémiával szembeni szelektív vulnerabilitásához. (*Milusheva E. and Baranyi M. Neurochem. Int. 43:543-50, 2003*).

Összefoglalva az eredményeket úgy tűnik, hogy ha az oxidatív stressz energiadepriváció talaján alakul ki, hatása a neurotransmitter felszabadulásra jóval kifejezettebb. Mivel a monoaminok autooxidáció vagy a MAO enzim révén maguk is forrásai a képződő oxidatív szabadgyököknek, az oxidatív stressz által kiváltott többlet noradrenalin/dopamin felszabadulásnak kiemelten fontos szerepe lehet a neurodegeneráció előidézésében.

5. P2X₇ receptor patológiás aktivációjának vizsgálata a patkány hippocampusban és primer kortikális sejtvonalon

A P2X receptorok neurodegenerációban játszott szerepét először primer kortikális sejtvonalon tanulmányoztuk, a lipcsei egyetem Farmakológiai Tanszékével folytatott együttműködésben, normoxiás és in vitro ischemia szerű állapotban. Az in vitro ischemia szerű állapotot a normoxiás állapotban 30 mM glükózt tartalmazó és 95% O₂ és 5% CO₂-vel szaturált médium glükóz mentes, argonnal szaturált médiummal történő helyettesítésével hoztuk létre. Ez a kezelés a sejt kultúrák ATP tartalmát és a nukleotid

tartalom alapján számolt energy charge értékét jelentősen, több, mint 50%-kal csökkentette le. A P2X₇ receptorok expresszióját mRNS és protein szinten vizsgáltuk, real-time PCR technika és immuncitokémia segítségével. A P2X₇ receptort kódoló mRNS expressziója a szérum depriváció, - mely egy jól ismert apoptotikus stimulus – hatására fokozatosan megemelkedett a sejt kultúrában, ugyanakkor nem tapasztaltunk különbséget az mRNS expresszióban a normoxiás és az ischemiás körülmények között, aminek az lehet a magyarázata, hogy már a szérum depriváció esetében maximálisra növelte a P2X₇ receptort kódoló gén átíródását, amely ezek után további stimulusokra már nem volt érzékeny. A nem kezelt és normoxiás sejt kultúrákon a P2X₇ receptor immunreaktivitás, - melyet konfokális lézer szkennelés mikroszkópiával vizsgáltunk - mind a neuronális marker MAP2-, mind a gliális marker GFAP fehérjével kolokalizációt mutatott. Emellett a P2X₇ receptor immunopozitív sejtek jelentős része a GABA immunopozitivitást is mutatott. Az mRNS expressziós vizsgálatok eredményeivel összhangban a P2X₇ receptor immunfluoreszcencia nem változott szignifikánsan az *in vitro* ischemiás kezelés hatására a GABA pozitív és a MAP2 pozitív sejtekben, a GFAP immunoreaktív sejtekben viszont az immunreaktivitás a normoxiás kezelés hatására fokozódott, amely aztán kismértékben tovább emelkedett az ischemiás kezelés hatására.

A normoxiás kultúrákon az ATP hatására koncentrációfüggő emelkedést tapasztaltunk a [³H]GABA felszabadulásban, a P2X₇ receptorok aktiválásának megfelelő 0.03-6 mM-os koncentrációtartományban. Ez a hatás jelentősen potenciózódott a sejt kultúrák ischemiás kezelését követően oly módon, hogy a hatásmaximum jelentősen fokozódott, a hatástartomány ugyanakkor a magasabb koncentrációtartomány irányába mozdult el (0.3-10 mM). Hasonló hatásokat figyeltünk meg a P2X₇ receptor agonista BzATP hatására és mind az ATP és a BzATP hatását gátolta a szelektív P2X₇ receptor antagonistá BBG és oxiATP, valamint a P2 receptor antagonistá PPADS. A P2X₇ receptorok funkcionális válaszkészsége tehát fokozódott az ischemiás stimulus hatására. Ez a preszinaptikus hatásmódú funkcionális válaszkészség fokozódás a [³H]GABA felszabadulás mellett a poszt-szinaptikus válaszban, a neuronokból elvezetett miniatűr GABAerg gátló poszt-szinaptikus áramok (mIPSC) frekvenciafokozódásában is megnyilvánult. Miközben a BzATP nem befolyásolta a mIPSC amplitúdóját, szignifikánsan fokozta azok frekvenciáját és ez a hatás egyrészt fokozottan érvényesült ischemiás előkezelést követően, másrészt gátolható volt a P2X₇ receptor antagonistá BBG-vel, illetve a GABA_A antagonistá bicuculline-nal. Nem gyakorolt hatást ugyanakkor a BzATP a GABA_A agonista muscimol által kiváltott ionáramokra, hatásmódja tehát valóban preszinaptikus.

Végül Ca²⁺ mikrofluorometria segítségével elemeztük az ATP és a BzATP hatását a neuronok szómájából és dendritjeiből, valamint az asztrocitákból elvezetett Ca²⁺ áramokra. Bár mind a dendritek, szómák és asztrociták válaszoltak Ca²⁺ szignállal az ATP illetve BzATP stimulációra mind normoxiás, mind ischemiás előkezelést követően, ennek a paraméternek a tekintetében nem tapasztaltunk funkcionális válaszkészség fokozódást az ischemia hatására, és ezt a hatást feltételezhetően nem P2X₇ receptorok közvetítik, mivel a szelektív P2X₇ receptor antagonistá BBG ezúttal hatástalan volt. Így megállapítható, hogy csak a preszinaptikus P2 receptorok válaszkészsége fokozódik az alkalmazott patológias stimulus hatására.

Összefoglalva az eredményeket, megállapítható, hogy a preszinaptikus P2X₇ receptorok funkcionális válaszkészsége fokozódik a kortikális sejteken energiadepriváció hatására, ami megerősíti az ATP és a P2X₇ receptorok, funkcionális jelentőségét a neurodegenerációban. Eredményeinket a J. Neurochemistry-ben publikáltuk (Wirkner K. és mtsai, J. Neurochem. 95:1421-37, 2005).

Vizsgálatainkat tovább folytattuk *in vitro* hippocampusz szeleteken is, megvizsgálva a fenti hipotézist egy, az *in vivo* körülményekhez közelebb álló kísérleti rendszeren. A hippocampusz szeleteken – tekintve, hogy ebben a kísérleti rendszerben az ATP primeren a glutamát felszabadulásra gyakorol hatást- a [³H]glutamát felszabadulást tanulmányoztuk, és mivel korábbi vizsgálatainkban a funkcionális P2X₇ receptorok jelenlétét már igazoltuk, az *endogén* ATP részvételét vizsgáltuk az energiadepriváció (95% O₂+5% CO₂+aglikémia) által kiváltott glutamát felszabadulásra. A kombinált oxigén-glükózdepriváció, a várákozásnak megfelelően jelentős emelkedést okozott a kiáramló [³H]glutamát mennyiségében és ebben a rendszerben is lecsökkentette az energy charge értékét. Az energiadepriváció által kiváltott [³H]glutamát felszabadulás emellett hőmérséklet és TTX-függő, de [Ca²⁺]_o - független volt, megfelelve az uralkodó nézetnek, mely szerint az excitotoxikus glutamát felszabadulás nagy része a Na⁺ függő transzporterek megfordulása útján

kerül az extracelluláris térbe. Az endogén ATP hatását a purin receptorokon P2 és adenosin receptor antagonistákkal függesztettük fel és tettük ezáltal láthatóvá. A P2 receptor antagonisták közül a PPADS, a szelektív P2X₇ receptor antagonista BBG, valamint a P2X₁ receptorra szelektív NF449 egyaránt szignifikánsan gátolta az ischemia által kiváltott [³H]glutamát felszabadulást és hasonló eredményt értünk el szelektív A₁ receptor antagonista DPCPX és a szelektív A_{2A} antagonista ZM241385 alkalmazásával is. Amennyiben az endogén ATP metabolizmusát szelektív ektoATPáz inhibitor ARL67156 segítségével meggátoltuk, a P2 receptor antagonisták hatása potenciórozódott, míg az adenosin antagonisták hatása felfüggesztődött. Eredményeink alapján megállapítható, hogy az endogén ATP a hippocampusban P2X₇ receptorok aktiválásával hozzájárul az energiadepriváció során kórosan fokozott glutamát felszabaduláshoz, emellett a glutamát felszabadulás facilitációjában P2X₃, A₁ és A_{2A} receptorok egyaránt részt vesznek. Ezeket az eredményeket eddig csak nemzetközi kongresszusokon prezentáltuk, de a közlemény írása folyamatban van.

6. Az IL-1β szerepe az adenosin neuroprotektív hatásában

További vizsgálatainkban az IL-1β [³H]purin felszabadulásra gyakorolt hatását tanulmányoztuk patkány hippocampus szeleteken. Kimutattuk, hogy már igen alacsony, a „fiziológiás” tartományba eső IL-1β adagok (3·10⁻¹⁸-3·10⁻¹⁴ M) koncentrációfüggő [³H]purin felszabadulást váltanak ki, mely gátolható az IL-1RI receptor antagonista IL-1ra (10⁻¹² M) – val. A trícium jelölés HPLC analízise alapján megállapítottuk, hogy az IL-1β hatására többek között a [³H]ATP és a [³H]adenosin szövetközi szintje is megemelkedik. Az IL-1β [³H]purin felszabadulásra gyakorolt hatását teljesen gátolta a Na⁺ csatorna gátló TTX (1 μM), az NMDA és non-NMDA receptor antagonista AP-5 (50 μM) és CNQX (10 μM), valamint a p38MAP kináz gátló SB203580 (1 μM). Az IL-1β által kiváltott [³H]purin felszabadulás emellett hőmérsékletfüggőnek bizonyult és a nukleozid transzporter gátló nitrobenziltioinozin (1-10 μM) is felfüggesztette. Eredményeink alapján tehát az IL-1β az excitátoros glutamáterg transzmisszió közvetítésével, az IL-1RI receptorok és a p38 MAP kináz enzim részvételével, a nukleozid transzporterek megfordítása útján idéz elő purin felszabadulást a hippocampusban. A jelenség magyarázatot szolgáltat that az IL-1β hasonlóan alacsony koncentrációban kifejtett, szinaptikus transzmissziót gátló hatására, amelyet adenosin receptor antagonisták gátolnak, tehát minden bizonnyal az általunk leírt, IL-1β által előidézett purin felszabadulás a közvetítője. Eredményeinket a J. Neuroimmunology-ban megjelent közleményben (*Sperlágh B. és mtsai, J. Neuroimmunol. 151:33-39, 2004*), valamint hazai és nemzetközi kongresszusokon) publikáltuk.

Ezeket kívül még további, az alábbiakban felsorolt eredményeket értünk el a pályázati fő célkitűzéseivel összhangban álló, de a tételen munkatervben nem szereplő témákban:

7. P2Y receptorok szerepe a prefrontális és parietális kéregben expresszált NMDA receptor ioncsatornák működésének szabályozásában

Vizsgálatainkban, melyet kollaborációban végeztünk Prof. Illés Péter és munkacsoportjával (Lipcsei Egyetem Farmakológiai Tanszék) a P2Y receptorok és az NMDA receptorok kölcsönhatását vizsgáltuk a patkány prefrontális kérgének V. rétegében. A kapott eredmények azt mutatták ki, hogy az ATP nem csak a serkentő P2X, hanem gátló P2Y receptoron keresztül is képes az agykéregben hatni a glutamáterg transzmisszióra – ellentétes előjellel. A P2Y₁ receptor szelektív agonistái tehát kiindulásul szolgálhatnak hatékony gyógyszerek szintéziséhez a glutamát excitotoxicitás okozta agykárosodás kezelésére, mivel a glutamát-excitotoxicitást közvetítő NMDA receptorokat a P2Y₁ receptorokon keresztül szelektíven lehet érzéketleníteni a glutamát, amely előrelépést jelentene a jelentős mellékhatásokkal bíró, NMDA receptor ioncsatorna blokkolókhöz képest (A munkából készült publikáció: *Luthard, J. és mtsai, Neurochem. Int. 1238:1-12, 2002*).

8. Adenozin hatása a CREB transzkripció aktivitására makrofág sejteken: a p38 MAP kináz enzim szerepe

Az adenozin immunmodulátor szerepe jól ismert, az adenozin receptor hatásokat közvetítő intracelluláris jelátvivő láncok identitása azonban csak részlegesen feltárt. A kísérletsorozatunk célkitűzése az adenozin transzkripció szintű hatásainak megismerése volt RAW 264.7 egér makrofág sejtvonalon. Az elért eredmények arra engednek következtetni, hogy az adenozin immunmoduláns hatásainak közvetítésében részt vehet a p38MAP kináz által indukált CREB transzkripció, bár a génexpresszió adenozin által indukált megváltozását nem tudtuk demonstrálni ezekben a kísérletekben, ami feltehetően a génátíródási válasz gyors lecsengésének köszönhető (A munkából készült publikáció: *Nemeth Z.H. és mtsai, Biochem. Biophys. Res. Commun.* 312:883-8., 2004).

9. P2X₇ receptorok szerepének vizsgálata a retina degenerációjában

Kísérletsorozatunkat a *retinitis pigmentosa* hereditár neurodegeneratív betegség állatmodelljén, a BALBCrds egereken, valamint a P2X₇ receptor génkiűtött egereken (P2X₇R -/-) és kontroll párjaikon végeztük. Megállapítottuk, hogy a P2X₇ receptort kódoló mRNS expressziója magasabb volt a BALBCrds egerek retinájában, mint a kontroll állatokban. Az immuncitokémiai vizsgálatok kimutatták, hogy a P2X₇ receptor immunfluoreszcencia a retinában a ganglion sejt rétegben található és kolokalizálódik a MAP-2 neuronális markerrel, gliális festődést azonban nem tapasztaltunk. A P2X₇ receptor immunreaktivitás nem volt kimutatható a P2X₇R -/- állatok retinájában. Az eredmények alapján felmerül, hogy a BALBCrds egerekben a retina degenerációját a P2X₇ receptorok korai felregulálódása okozza. Az eredményekből egy, a *Neurochem. Int.*-ben megjelent közlemény született (*Franke H. és mtsai, Neurochem. Int.* 47: 235-42, 2005).

10. Az NTPDáz1 enzim expressziójának vizsgálata humán kardiovaszkuláris betegekből származó mintákon

A kísérletsorozatban az extracelluláris ATP szövetközi inaktivációjáért felelős NTPDáz1/CD39 enzim expresszióját, valamint az extracelluláris ATP metabolizmusát vizsgáltuk műtéti anyagból származó humán szívszövet mintákon, melyek ischémias szívbetegségekből származtak. Kontrollként transzplantációs donorokból származó mintákat használtunk. Kimutattuk, hogy az ATP metabolizmusa megváltozik a patológiás mintákban: az ATP degradációja gyorsabb, és több inozin keletkezik, mint a kontroll mintákban. Az NTPDáz1 enzim expressziós mintázata és eloszlása ugyancsak megváltozik a patológiás mintákban. Az extracelluláris ATP megváltozott szövetközi metabolizmusa minden bizonnyal befolyásolja a P2 receptorokon, endogén ligandok vagy gyógyszerjelölt vegyületek által okozott hatásokat is. Az eredményeket a *Histochem. Cell. Biol.*-ban közzétettük (*Kittel A. és mtsai, Histochem. Cell Biol.* 124:53-61, 2005).

Végül, a pályázat témaköréből 2 összefoglaló közleményt (*B. Sperlágh, E. S. Vizi, K. Wirkner and P. Illes, P2X₇ receptors in the nervous system. Progress in Neurobiology*, és *B. Sperlágh and P. Illes, Purinergic modulation of microglial cell activation, Purinergic Signalling*) és 1 könyvfejezetet (*B. Sperlágh, Chapter 14. ATP mediated signaling in the nervous system. In: Handbook of Neurochemistry and Molecular Biology, 3rd Edition, Vol 2. Neurotransmitter systems, Eds. E. S.- Vizi and M. Hamon, Kluwer Academic/Plenum Publishing*) is írtunk, amelyeket közlésre elfogadtak, és 2006 folyamán fognak megjelenni.

Dr. Sperlágh Beáta
témavezető